

Estrés oxidativo en los protocolos de criopreservación de *Mentha x piperita*

C. Kremer¹, M.T. Solis², M.E. Gonzalez-Benito^{1*}, P.S. Testillano², C. Martin¹

¹ Departamento de Biotecnología- Biología Vegetal, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid. ² Grupo de Biotecnología del Polen de Plantas Cultivadas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid. me.gonzalezbenito@upm.es

La crioconservación ofrece una serie de ventajas sobre otros métodos para la conservación a largo plazo del germoplasma de especies de propagación vegetativa. En comparación con la conservación *in vitro* tiene la ventaja de reducir los posibles cambios genéticos que pueden ocurrir. Sin embargo, hay algunos trabajos en los que se ha encontrado inestabilidad genética y epigenética después de la criopreservación. Estos cambios podrían estar relacionados con el estrés impuesto durante la aplicación de tratamientos para la crioprotección del material vegetal. Algunas de estos estreses están relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden causar daño oxidativo y reducir la viabilidad de los tejidos. Las ROS pueden ser detectadas y localizadas *in situ* mediante el uso de sondas fluorescentes, como el DHE, que reacciona *in vivo* con ROS, preferentemente con los aniones superóxido, y permite su localización *in situ* mediante análisis con microscopía confocal (Rodríguez-Serrano et al. 2012).

Se procedió a cuantificar y detectar el estrés oxidativo con el uso de estas técnicas después de diferentes pasos de un protocolo de crioconservación por encapsulación-deshidratación: endurecimiento de los segmentos nodales a 25 ° C 16 h de luz / -1 ° C 8 h oscuridad durante 3 semanas (N); ápices cultivados en 0,3 M de sacarosa por 1 día (P); ápices encapsulados en cuentas de alginato cultivados en medio con 0,75 M de sacarosa por 1 noche (S). También se evaluó el efecto de la adición de ácido ascórbico 0,43 mM, como un inhibidor / eliminador de ROS, en dos pasos (P y S).

Después de la etapa S se observó con DHE un aumento de la señal de fluorescencia, lo que indica la producción de radicales superóxido. Dicha señal disminuyó con la inclusión de ácido ascórbico en el medio. Estos resultados confirmaron que el daño producido por la oxidación podría mitigarse con la inclusión de antioxidantes en las etapas críticas del protocolo de crioconservación.

Investigación llevada a cabo dentro del proyecto AGL2010-21989-C02-01, y parcialmente financiada con proyectos BFU2011-23752 y AGL2014-52028-R del MINECO.

Rodríguez-Serrano M, Barany I, Prem D, Coronado MJ, Risueño MC, Testillano PS. (2012). NO, ROS and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *J. Exp. Botany*, 63, 2007-2024.